

Проектирование референсных электродов в биоэлектронных приборах

© Н.А. Бойцова,¹ А.А. Абелит,¹ Н.А. Верлов,² Д.Д. Ступин¹

¹ Академический университет им. Ж.И. Алфёрова РАН,
194021 Санкт-Петербург, Россия

² Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константина
Национального исследовательского центра „Курчатовский институт“,
188300 Гатчина, Ленинградская область, Россия
e-mail: natab2002@yandex.ru

Поступило в Редакцию 2 марта 2026 г.

В окончательной редакции 10 июля 2026 г.

Принято к публикации 10 июля 2026 г.

Исследована экспериментально и теоретически зависимость электрических свойства системы биоэлектронный „рабочий электродреференсный электрод“ от их взаимного расположения и их относительных размеров.

Ключевые слова: импеданс, ECIS, мультиэлектродные матрицы, референсный электрод.

DOI: 10.61011/JTF.2026.11.63776.59-26

Введение

Первая четверть XXI в. была ознаменована выдающимися достижениями в области биоэлектронных технологий: за этот период времени благодаря плодотворному симбиозу физики, медицины и биологии появились и стали активно применяться на практике такие уникальные приборы, как импедансные клеточные анализаторы, сенсоры нейрональной активности, включая мультиэлектродные матрицы и patch-clamp-технологии, а также нейропротезы [1–6]. С инженерной точки зрения, в основе вышеперечисленных биоэлектронных систем лежит применение массивов из микроэлектродов (так называемых „рабочих электродов“, working electrodes), предназначенных как для измерения импеданса, биотоков и биопотенциалов биологических объектов, так и для их электрической стимуляции. Например, для исследования живых клеток *in vitro* широкую популярность приобрели мультиэлектродные матрицы (МЭМ), а также аналогичные им по устройству специальные культивационные планшеты, представляющие собой чашки Петри с расположенными на дне микроэлектродами, размер, количество и форма которых варьируются в зависимости от предназначения МЭМ. В частности, для исследования нейрональной активности и для измерения биоимпеданса одиночных клеток используются и планарные, и трехмерные микроэлектроды круглой или квадратной формы с размерами 30–100 μm , а для биоимпедансного исследования клеточных популяций применяются, как правило, круглые планарные рабочие электроды с характерным размером более 100 μm (система ECIS от Applied Biophysics) и планарные встречно-штыревые контакты, полностью заполняющие дно чашки Петри (система xCelligence от ACEA BioScience [1]). В системах зрительного протезирования применяются имплан-

тируемые внутри глаза планарные или игольчатые микроэлектроды, размер которых может варьироваться от 50 μm до нескольких миллиметров [2]. В то же время, однако, работа вышеописанных рабочих микроэлектродов невозможна без применения референсных электродов (РЭ) (reference electrodes или counting electrodes в зарубежной литературе), которые обеспечивают замыкание электрической цепи „электроника–рабочие электроды–живые клетки“. Как правило, такие электроды располагаются на периферии биоэлектронного прибора и имеют большую площадь для нивелирования влияния их импеданса на электрические измерения или стимуляцию. Например, в МЭМ и в системах биоимпедансного анализа РЭ располагаются около краев культивационных чашек Петри и имеют размеры более 100 μm , а в системах ретинального зрительного протезирования РЭ имеют макроскопические миллиметровые размеры и располагаются в теле пациента так, чтобы стимулирующий ток протекал преимущественно через нервные клетки сетчатки. Соответственно выбор расположения и размеров РЭ, наряду с оптимизацией свойств рабочих микроэлектродов, является важной физико-технологической задачей при проектировании биоэлектронных приборов. Ранее в работе [7] было проведено исследование импедансных свойств рабочих микроэлектродов в зависимости от их размера и расстояния до РЭ. В результате авторы данной работы получили для импеданса рабочих электродов выражения в телеграфном приближении, которые, однако, из-за своей громоздкой записи крайне затруднительно анализировать и применять на практике. Также авторами работы [7] не были в полной мере исследованы резистивные свойства системы „рабочий электрод–референсный электрод“, в частности, не было проведено изучение одновременного влияния как размеров РЭ, так и расстояния от него до рабочего электрода

на проводимость между ними. В настоящей работе мы отказались от использования громоздкого телеграфного приближения из работы [7] для описания свойств системы „рабочий электрод–РЭ“ в пользу подхода на основе решения уравнения Лапласа, который для двух частных случаев — игольчатых электродов и плоско-параллельных электродов — оказался более эффективным и позволил наглядно построить стратегии для проектировании РЭ в биоимпедансных исследованиях. Качественное согласие между разработанными моделями и поведением реальных биоимпедансных систем было нами также подтверждено экспериментально на примере исследования гибели клеток HeLa в биоимпедансном эксперименте с одновременным использованием микро- и макроскопических РЭ.

1. Простая качественная модель описания взаимодействия рабочих электродов с РЭ

Для изучения резистивной составляющей R системы „рабочий электрод–референсный электрод“ необходимо найти распределение потенциала в пространстве между ними, для чего в случае реальной системы электродов придется решать уравнение Лапласа с очень неудобным выбором граничных условий, что, скорее всего, приведет к отсутствию у него простого аналитического решения. Поэтому для анализа R попробуем заменить исходную задачу о взаимодействии в системе „рабочий электрод–РЭ“ на ее модельный частный случай, а именно рассмотрим безразмерный двумерный потенциал

$$\phi(x, y) = \ln \frac{(1+x)^2 + y^2}{(1-x)^2 + y^2}, \quad (1)$$

который моделирует распределение поля между длинными цилиндрическими (игольчатыми) электродами (рис. 1). Экипотенциали $\phi = \text{const}$ представляют собой окружности с радиусами $r = 1/\text{sh}(\phi/2)$ и центрами в точках $\text{cth}(\phi/2)$. Общие черты полученного решения можно будет использовать в качестве отправных точек при поиске оптимальных РЭ в реальных задачах.

Полный ток через такую систему будет равен потоку от плотности тока через экипотенциаль $\phi = 0$ и не будет зависеть от выбора референсного электрода. Однако разность потенциалов между референсным и рабочим электродами от такого выбора будет зависеть, и она же будет определять радиус электродов и расстояние между ними. Если разность потенциалов будет большая, то референсные электроды будут сгущаться у точки $(1,0)$, и тогда расстояние между электродами будет слабо зависеть от их выбора.

Если в такой системе в качестве электродов выбрать один цилиндр-экипотенциаль слева от экипотенциали $\phi = 0$ и один справа от нее, то независимо от такого выбора ток J между электродами будет сохраняться, потому что потенциал во всех точках не изменится.

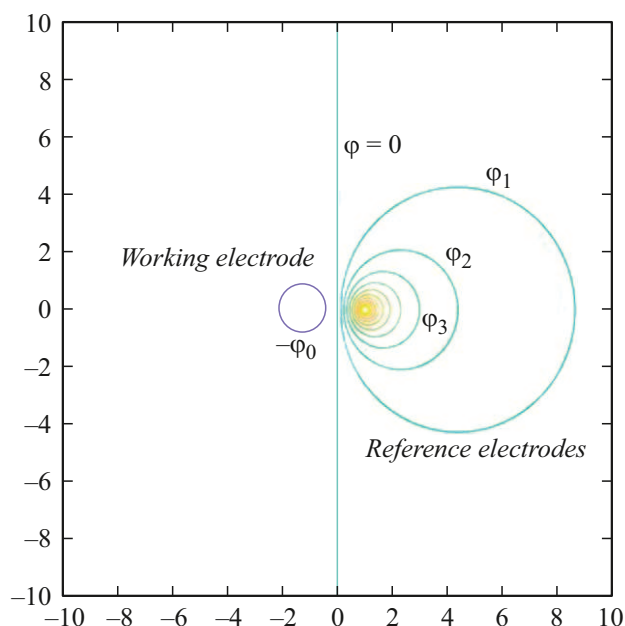


Рис. 1. Экипотенциальные поверхности потенциала (1) и их интерпретация для задачи о сопротивлении системы „рабочий электрод–референсный электрод“. Здесь потенциал рабочего электрода $-\phi_0$, а остальные потенциалы относятся к референсным электродам ($-\phi_0 < \phi_1 < \phi_2 < \phi_3$).

Однако выбор электродов будет, конечно, влиять на разность потенциалов между ними.

Пусть электрод слева будет рабочим, и пусть он будет иметь потенциал $-\phi_0$, а электроды справа пусть будут референсными с потенциалом ϕ . Тогда сопротивление между электродами можно выразить как

$$R = \frac{\phi + \phi_0}{J} = [2\text{arsh}(2\pi h/S) + \phi_0]/J. \quad (2)$$

Если разность потенциалов выбрать достаточно большой, чтобы сдвигом центров цилиндров можно было пренебречь, то из (2) становится видно, что с ростом площади референсного электрода S сопротивление МЭМ падает (здесь h — высота электродов).

2. Численное моделирование взаимодействия системы „РЭ–рабочий электрод“

Тенденцию, аналогичную (2), демонстрирует также численный расчет, представленный на рис. 2, который был выполнен в пакете MatLab с помощью инструмента Partial Differential Equation Toolbox (скрипты для расчетов доступны по запросу). В качестве модельной задачи рассматривался двумерный прямоугольный ящик, на двух гранях которого друг напротив друга располагались референсный и рабочий электроды (рис. 2, справа). Между этими электродами для всех численных экспериментов поддерживалась одна и та же разность

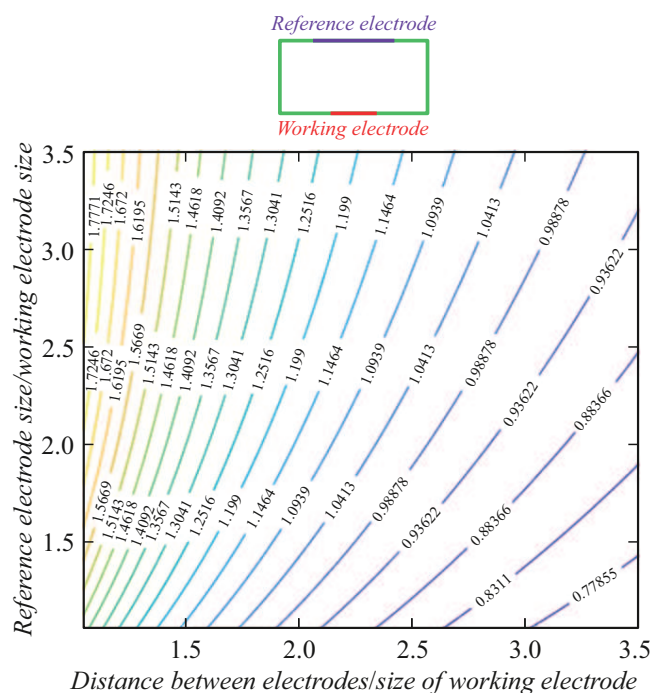


Рис. 2. Моделирование системы „референсный электрод–рабочий электрод“. Справа представлено схематическое изображение моделируемой системы, которая состоит из прямоугольного ящика, в двух противоположных торцах которого располагаются рабочий электрод и РЭ. Слева изображена номограмма для значений токов, которые протекают в такой системе для разных соотношений между размерами электродов и для разного расстояния между ними при неизменном значении приложенного к электродам напряжения (каждая кривая относится к определенному значению тока, указанному на ней, и показывает, при каких размерах РЭ и при каких расстояниях от него до рабочего электрода такое значение можно получить). Значения токов отложены в произвольных единицах.

потенциалов, а для остальных участков прямоугольника в качестве граничного условия было поставлено отсутствие протекания тока через них. В процессе численного решения уравнения варьировались относительные размеры электродов и расстояние между ними.

Как видно из результатов данного моделирования, протекающий через электроды ток падает с увеличением расстояния между электродами и растет с увеличением размера РЭ, что из общих соображений является естественным явлением. Однако нелинейный характер представленных на рис. 2 кривых указывает на то, что в системе „РЭ–рабочий электрод“ при повышении расстояния между электродами может потребоваться значительное увеличение размера РЭ для сохранения значения протекающего между ними тока.

Таким образом, из двух предыдущих разделов можно сделать вывод о том, что РЭ выгодно делать большими по площади, что будет подтверждено в следующем разделе экспериментально.

3. Экспериментальное исследование влияния размера РЭ на свойства контакта металл/электролит/клетки (МЭК)

Для демонстрации влияния размера РЭ на работу биоимпедансных цитосенсоров мы исследовали электрические свойства покрытого клетками HeLa микроэлектрода мультиэлектродной матрицы 60StimMEA200/30-Ti (MultiChannels Systems, Германия) до и после их гибели под действием детергента Тритон X100 (Sigma Aldrich, США). Во время эксперимента мы использовали два типа РЭ, один из которых по своим размерам с рабочим электродом ($200 \times 50 \mu\text{m}^2$) и был встроен в МЭМ, а второй был изготовлен из платиновой полоски, имел миллиметровые габариты и погружался в чашку Петри с помощью напечатанного на 3D-принтере кронштейна таким образом, чтобы он находился на таком же расстоянии от рабочего электрода, на каком находится и микрометровый РЭ (рис. 3, а, б). Техника изготовления миллиметрового РЭ была нами ранее описана в [8]. Результаты данного исследования приведены на рис. 3, с. Как видно из полученных данных, оба типа РЭ позволяют по уменьшению импеданса контакта МЭК зарегистрировать гибель клеток. Однако использование макроскопического миллиметрового РЭ позволяет примерно в 1.5 раза увеличить проводимость контакта МЭК по сравнению с использованием микроскопического РЭ, что соответствует увеличению соотношения сигнал/шум на 3.5 dB. Данное улучшение измерительной техники существенно для работы биоэлектронных приборов как в лабораторных, так и во внелабораторных условиях [9]. Таким образом, как и предсказывалось в предыдущих разделах, применение РЭ с большой площадью обеспечивает уменьшение сопротивления между рабочим электродом и РЭ, что в итоге приводит к улучшению работы биоимпедансных цитосенсоров благодаря повышению уровня тока, протекающего через их электроды.

Выводы и заключение

В настоящем исследовании были продемонстрированы экспериментально и теоретически преимущества использования в биоэлектронных приборах макроскопических РЭ большой площади. В частности, нами была предложена качественная теоретическая модель, описывающая взаимодействие между цилиндрическими несоосными электродами, из которой следует, что с увеличением площади РЭ сопротивление между ними падает, хоть и нелинейно. Это теоретическое следствие было нами также качественно подтверждено как численно, так и в биофизическом эксперименте. Мы надеемся, что результаты данного исследования смогут найти применение при проектировании всех типов биоэлектронных приборов — от импедансных сенсоров до зрительных протезов.

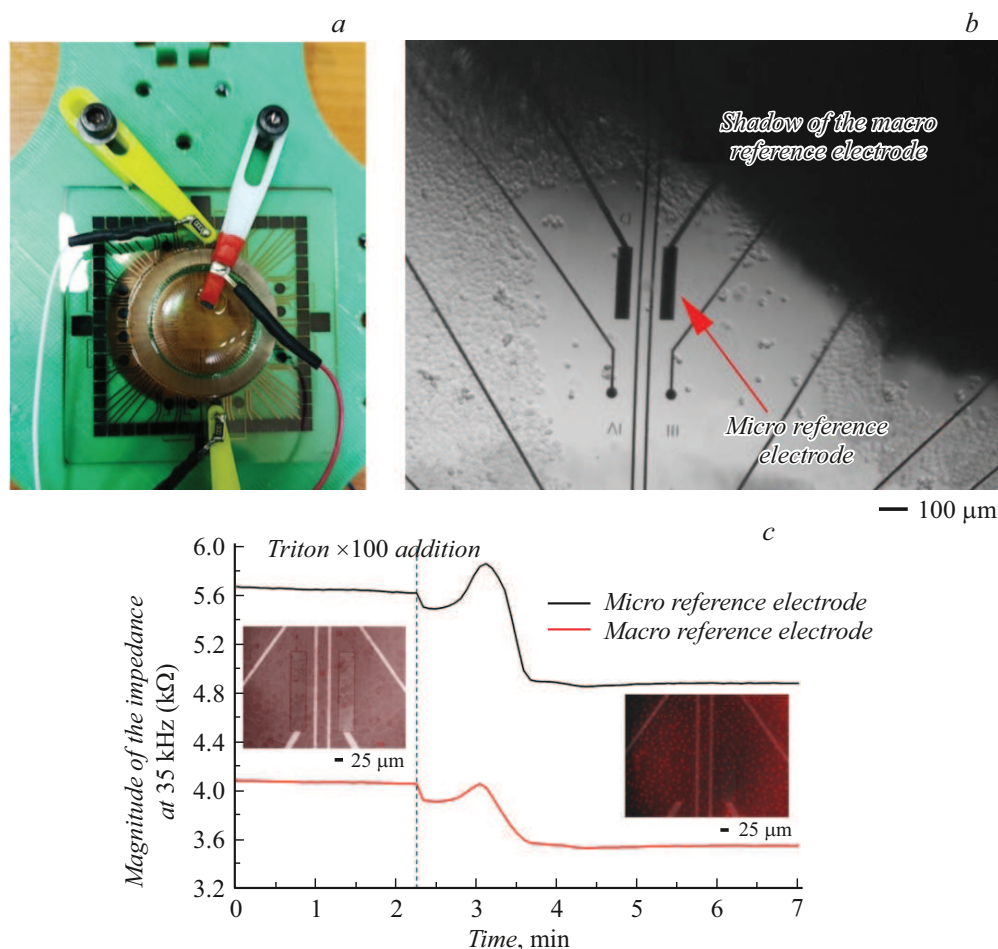


Рис. 3. Влияние размеров РЭ на адмиттансный спектр контакта МЭК. *a* — внешний вид схемы подключения МЭМ к двум РЭ (изображены сверху фото, макроскопический электрод подключен к красному проводу справа). *b* — микрофотография РЭ. На изображении слева сверху присутствует тень от макро РЭ. *c* — эволюция импеданса, покрытого клетками электрода, отображающая динамику гибели клеток HeLa под действием детергента Тритон X100. На фотографиях представлены изображения электрода с клетками до и после добавления детергента (красное свечение соответствует флуоресценции иодистого пропидия, свидетельствующее о гибели клеток).

3.1. Благодарности

Авторы выражают благодарность М.И. Блиновой, Н.А. Князеву, В.Б. Казанцеву и М.В. Дубине за всестороннюю помощь и поддержку.

Финансирование работы

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание FSRM-2024-0001).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

[1] D.D. Stupin, E.A. Kuzina, A.A. Abelit, A.K. Emelyanov, D.M. Nikolaev, M.N. Ryazantsev, S.V. Koniakhin, M.V. Dubina. ACS Biomaterials Science & Engineering, **7** (6), 1962 (2021).

[2] В.В. Нероев, Ю.С. Астахов, М.М. Лобанова, Д.Д. Ступин, Н.А. Верлов, М.Н. Рязанцев, О.В. Зайцева, А.А. Богданов, В.Н. Васильев, М.В. Дубина. Российский офтальмологический журнал, **11** (3), 3 (2018).
 [3] W.G. Jiang (editor). *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing and Cancer Metastasis* (Springer Science & Business Media, 2012).
 [4] M. Bisio, A. Pimashkin, S. Buccelli, J. Tessadori, M. Semprini, T. Levi, I. Colombi, A. Gladkov, I. Mukhina, A. Aversa, V. Kazantsev, V. Pasquale, M. Chiappalone. Adv. Neurobiol., **22**, 351 (2019). DOI: 10.1007/978-3-030-11135-9_15
 [5] A.Yu. Rotov, M.L. Firsov. J. Evolutionary Biochemistry and Physiology, **58** (6), 1675 (2022).
 [6] M. Nikolaev, E. Gataulina, I. Fedorova, N. Balceva, M. Baranov, A. Vassilevski, D. Tikhonov. British J. Pharmacology, **182** (21), 5173 (2025).
 [7] X. Zhang, W. Wang, A.N. Nordin, F. Li, S. Jang, I. Voiculescu. Sensors and Actuators B: Chemical, **247**, 780 (2017).
 [8] А.А. Абелит, Н.А. Бойцова, Н.А. Верлов, Д.Д. Ступин. Письма в ЖТФ, **51** (24), 21 (2025).
 [9] Boitsova, Natalia A., Anna A. Abelit, Nikolai A. Verlov, and Daniil D. Stupin. St. Petersburg Polytechnic University Journal: Physics and Mathematics **82**, (3.1) (2025)